

RESISTÊNCIA MULTIPLA E RESPOSTA DE HIPERASENSIBILIDADE DO CAFEIRO 'CONILON 14' A *MELOIDOGYNE* SPP¹.

Edriana Araújo de Lima², Cleber Furlanetto³, Mariana G. Sousa⁴, Ana Cristina M. Menezes⁵, Fábio Rodrigues de Sousa⁶, Maria Ritta Alves Almeida⁷, Aldemiro Sergio Júnior⁸, Maria Amélia Ferrão⁹ & Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro¹⁰

¹Trabalho financiado pelo consorcio brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café

² Estudante de Doutorado da Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília-DF, edrianaal@gmail.com

³ Professor da Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília-DF, cfurla@hotmail.com

⁴ Bolsista do Consorcio de Pesquisa do Café, marianaevellin@gmail.com

⁵ Assistente da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil, ana.gomes@embrapa.br

⁶ Bolsista do Consorcio de Pesquisa do Café, fabiorod.s@hotmail.com

⁷ Bolsista do Consorcio de Pesquisa do Café, lalves.lie@gmail.com

⁸ Bolsista do Consorcio de Pesquisa do Café, aldemirojunior@gmail.com

⁹ Pesquisadora da EMBRAPA/CAFÉ/INCAPER, mferrao@incaper.es.gov.br

¹⁰ Pesquisadora da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil, regina.carneiro@embrapa.br

RESUMO: Os nematóides das galhas (NG), *Meloidogyne* spp. causam um grande impacto econômico na produção de café no Brasil. Embora, *Coffea canephora* seja fonte de resistência a *Meloidogyne* spp., não existem estudos histológicos que comparem mecanismos de resistência de cafeeiros: suscetível e resistente. Dois clones de cafeeiros Conilon, 14 e 22, foram selecionados previamente, como resistente e suscetível a *M. incognita* e *M. paranaensis*. A reação dos diferentes clones foi semelhante para as duas espécies de nematóides estudadas. O clone 14 apresentou reação de hipersensibilidade (RH) a partir do 4° ao 6° dias após a inoculação (DAI), na região do cortex da raiz, o que provocou morte celular, impedindo o nematoide de se desenvolver. Ao 12° DAI, ocorreu a formação de poucas células gigantes na região do cilindro vascular, ao lado de J3/J4 se desenvolvendo normalmente. A partir do 20° ao 45°DAI foi observada RH, com morte celular ao redor de fêmeas e células gigantes, estando essas completamente degeneradas. Nesse período, algumas fêmeas que conseguiram se desenvolver apresentaram formação de primórdios dos ovários e não se observou a produção de ovos. Já nos clones suscetíveis, 22 e Catuaí IAC 81, células gigantes bem formadas e fêmeas adultas apareceram do 38° ao 45° DAI, com produção de ovos. Algumas plantas inoculadas foram mantidas até o 300 DAI para quantificar novamente os Fatores de Reprodução (FR). Esses resultados servirão de base para estudos posteriores de expressão gênica para examinar profundamente a resistência ao NG a nível molecular.

PALAVRAS-CHAVE: nematóides, cilindro vascular, nível molecular.

MULTIRESISTANT REACTION AND HYPERSENSITIVE RESPONSE OF "CONILON 14" COFFEE TO *MELOIDOGYNE* SPP.

ABSTRACT: Root-knot nematodes (RKN), *Meloidogyne* spp. cause major economic impact on coffee production in Brazil. Although *Coffea canephora* is a source of resistant genes to *Meloidogyne* spp., there are no histological studies comparing mechanisms of resistance of susceptible and resistant coffee plants. Two clones of Robusta coffee, 14 and 22, were selected, previously, as respectively resistant and susceptible to *M. incognita* and *M. paranaensis*. Roots of both clones plus *C. arabica* (Catuaí IAC 81, a susceptible standard pattern were fixed according to methods of Byrd (1983) and Pegard et al. (2005). The reaction of different clones to the two nematode species studied was similar. Clone 14 showed hypersensitivity reaction (HR) between the 4th and 6th days after inoculation (DAI) in the root cortex, leading to cell death, which prevented the nematode development. At 12 DAI, small number of giant cells formed in the vascular cylinder besides normally developing J3/J4. From the 20th to 45th DAI, HR was observed along with dead cells around females and completely degenerated giant cells. During this period, some fully-grown females even developed early stages of ovaries, although they did not produce eggs. In the susceptible clones, 22 and Catuaí IAC 81, well-formed giant cells and adult females appeared between the 38th and 45th DAI, also with egg production. Inoculated plants were maintained until 300 DAI to quantify again the Reproduction Factor (RF). These results will provide bases for further gene expression studies, which will profoundly examine resistance to RKN at the molecular level.

KEYWORDS: nematode, vascular cylinders, molecular level.

INTRODUÇÃO

Os nematóides das galhas (NG), *Meloidogyne* spp., tornaram-se uma grande problema em várias áreas de cultivo de café em todo o mundo. Até agora, 17 espécies foram descritas como patógenos cafeeiro (Carneiro & Cofcewicz, 2009). Dentre essas espécies, as mais prejudiciais são *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, que constituem um problema fitossanitário grave devido à sua ampla distribuição na América do Sul e Central (Campos & Villain, 2005). A resistência genética a *M. exigua* foi avaliada utilizando-se os bancos de germoplasma do cafeeiro de vários países (Brasil, Colômbia e América Central). Entretanto, não foram encontrados em *C. arabica* (Caturra, Catuaí, Mundo Novo, entre outros), acessos resistentes (Curi et al, 1970, Fazuoli & Lordello, 1978; Arango et al. , 1982; Bertrand et al, 1995). Por outro lado, vários acessos resistentes foram identificadas em *C. canephora* e em algumas progênies de híbridos interespecíficos de *C. arabica* e *C. canephora* (Curi et al, 1970, Bertrand et al, 1995, 1997, Gonçalves & Pereira, 1998; Silvarolla et al, 1998; Anthony et al, 2003). Os porta-enxertos multirresistentes 'Nemaya' (cruzamento entre os clones de *C. canephora* T3561 T 3751) e Apoatã IAC 2258 (*C. canephora* cv. 2.258 da coleção de germoplasma CATIE, Turrialba, Costa Rica) foram criados para controlar os principais problemas associados aos NGs na América Central e no Brasil (Anzueto et al, 2001; Fazuoli et al, 2002). No entanto, o porta-enxerto Apoatã mostrou intolerância à seca, em condições de campo (Wallace Gonçalves, informar. pess.). Estudos realizados com cafeeiros grupo Conilon concluíram que existem fontes de resistência genética em várias variedades a *M. paranaensis*, a *M. exigua* virulento e avirulento e a populações de *M. incognita* (raça 1 e raça 3) e que o clone 14 (tolerante à seca) foi altamente resistente a todas as espécies e populações de *Meloidogyne* do cafeeiro testadas (Carneiro et al., 2009). O objetivo do presente trabalho foi confirmar a resistência do cafeeiro 'Conilon 14', tolerante à seca, em relação às principais espécies de *Meloidogyne*, e estudar os mecanismos de resistência que estão operando nesse cafeeiro para controlar a infecção causada por *M. incognita* e *M. paranaensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois clones de cafeeiros Conilon, 14 e 22, o primeiro tolerante à seca e o segundo não, foram previamente selecionados como resistente e suscetível a *M. incognita* e *M. paranaensis*, respectivamente. Essas plantas foram cultivadas em vasos contendo areia e inoculadas com 10.000 J2, obtidos através do método de Flegg, (1967). As raízes desses dois clones e mais o padrão de suscetibilidade de *C. arabica* (Catuaí IAC 81) foram tratadas pelos métodos de Byrd (1983) e Pegard et al. (2005), aos 4, 8, 12, 16, 20, 25, 32, 38 e 45 dias após a inoculação (DAI). Os cortes foram observados ao Microscópio de luz (Axiophot), para análise e fotodocumentação. As plantas não usadas na histopatologia foram avaliadas para corroborar os resultados prévios de resistência/suscetibilidade após 300 DAI. Os cafeeiros foram avaliados quanto ao número total de ovos por sistema radicular (Bonneti & Ferraz (1987) e calculados os fatores de reprodução (FR) (FR=População final/população inicial), de acordo com a metodologia descrita por Bonneti & Ferraz (1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação dos três diferentes clones foi semelhante para as duas espécies de nematóides estudadas, ou seja, *M. paranaensis* ou *M. incognita* (Tabela 1). Nos clones suscetíveis, 22 e Catuaí IAC 81 aos 4 DAI (dias após a inoculação), J2s em migração apareceram tanto na região cortical (co) como no cilindro vascular (cv) (Fig. 1 A,B). Dos 8-32 DAI, apareceram J2/J3 ou J4 ao lado de células gigantes em formação (Fig.1 C-E). Dos 38-45 DAI células gigantes bem formadas (Fig. 1 F), aparecem ao lado de fêmeas adultas com produção de ovos. A reação compatível de ambos (clone 22 e IAC 81) foi semelhante. O clone 14 resistente apresentou reação de hipersensibilidade (RH) a partir do 4° ao 8° DAI na região do cortex da raiz, o que provocou morte celular, impedindo alguns nematoides de se desenvolver (Fig.2 A, B). Aos 8 DAI, ocorreu a formação de células gigantes na região do cilindro vascular ao lado de J3/J4 se desenvolvendo normalmente (Fig. 2 C). A partir do 12 DAI algumas células gigantes apareceram muito vacuolizadas com poucos núcleos (Fig. 2 D), dando a idéia de uma desestruturação celular. Do 20° ao 45° DAI foi observada RH muito forte com morte celular ao redor de fêmeas e células gigantes e essas completamente degeneradas (Fig. 2E-H). Nesse período, algumas fêmeas que conseguiram se desenvolver apresentaram formação de primórdios dos ovários (Fig. 2G) e não se observou a produção de ovos. Tanto no mecanismo inicial como no final ocorreu a produção de compostos fenólicos (Fig. 2), que podem ser observados sobueto em UV (Fig. 2 B-F), através da coloração azul acinzentada. Resultados semelhantes foram observados em *C. arabica* (Iapar-59) por Anthony et al. (2005) que visualizaram ao microscópio de luz, áreas com degradação do citoplasma fortemente coradas com fuccina ácida no primeiros dias (4-6 DAI) nas raízes infectadas com *M. exigua*. Foram observadas também poucas células gigantes com citoplasma alterado, altamente vacuolizadas, com paredes celulares finas e irregulares ao lado de nematoides pouco desenvolvidos até o 14 DAI. Albuquerque et al. (2010), observaram reação semelhante nos primeiros dias em café moderadamente resistente UFV 408-28 infectado com *M. incognita* porém, não houve desenvolvimento do nematóide até os estágios mais avançados. A presença tardia de RH circundando os nematóides e células gigantes nunca havia sido observada no patossistema cafeeiro-nematóide e trata-se de um novo mecanismo de resistência.

CONCLUSÕES

1. O Clone 14 do cafeeiro Conilon apresentou resistência múltipla a *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis*.
2. Três mecanismos de resistência foram observados no café Conilon Clone 14, um inicial durante a migração do J2 nas células corticais, com nítidas RH e morte celular, impedindo a migração do J2; e outros dois, mais tardios: o primeiro com morte celular muito intensa ao redor de fêmeas jovens e sítios de alimentação; e o segundo, com vacuolização e degeneração citoplasmática interna das células gigantes.

Tabela 1. Valores médios de massa fresca radicular (MFR), índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne incognita* raça 3 e *M. paranaensis* em clones de *Coffea canephora* do grupo Conilon.

Genótipo	<i>M. incognita</i> raça 3 (Est I2)				<i>M. paranaensis</i> (Est P1)			
	MFR	IG *	IMO*	FR/Reação**	MFR	IG*	IMO*	FR/Reação**
Catuai vermelho IAC 81	44,3	4,9	4,8	36,2 S	46,2	4,5	5,0	32,5 S
Clone 14	40,6	2,2	0,5	0,28 R	43,0	2,2	0,0	0,35 R
Clone 22	56,1	3,4	4,7	8,4 S	38,4	3,28	4,71	18,05 S

*Índice de galhas e massas de ovos conforme a escala de notas descrita por Hartman & Sasser (1985). 0= ausência de galhas ou massas de ovos, 1= 1-2 galhas ou massas de ovos, 2= 3-10, 3= 11-30, 4= 31-100, 5= acima de 100 galhas ou massas de ovos.

**Reações de resistência de acordo com Oostenbrink, 1966: FR<1,0 - R=Resistente e FR≥1,0 - S=Suscetível.

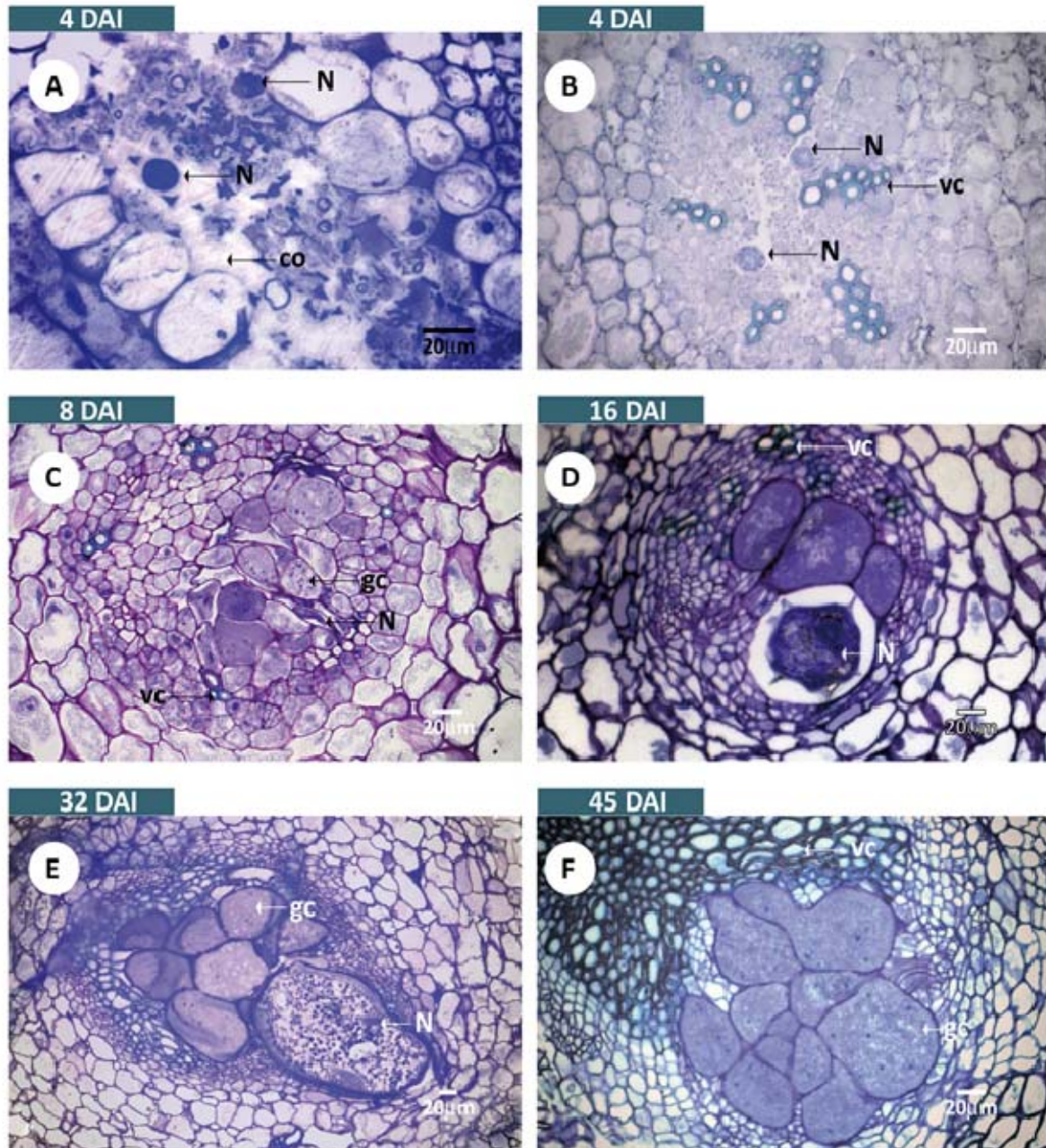


Figura 1. A – Seções de raízes de *Coffea canephora* Conilon clone 22 (susceptível) inoculadas com *Meloidogyne paranaensis*. A, B: J2s penetrando e já localizados no cilindro vascular; C, D: formação de fêmeas jovens ao lado de células gigantes em formação; E, F: fêmeas jovens ou adultas ao lado de células gigante. N=nematoide, co=córtex, vc=vasos condutores, gc=célula gigante.

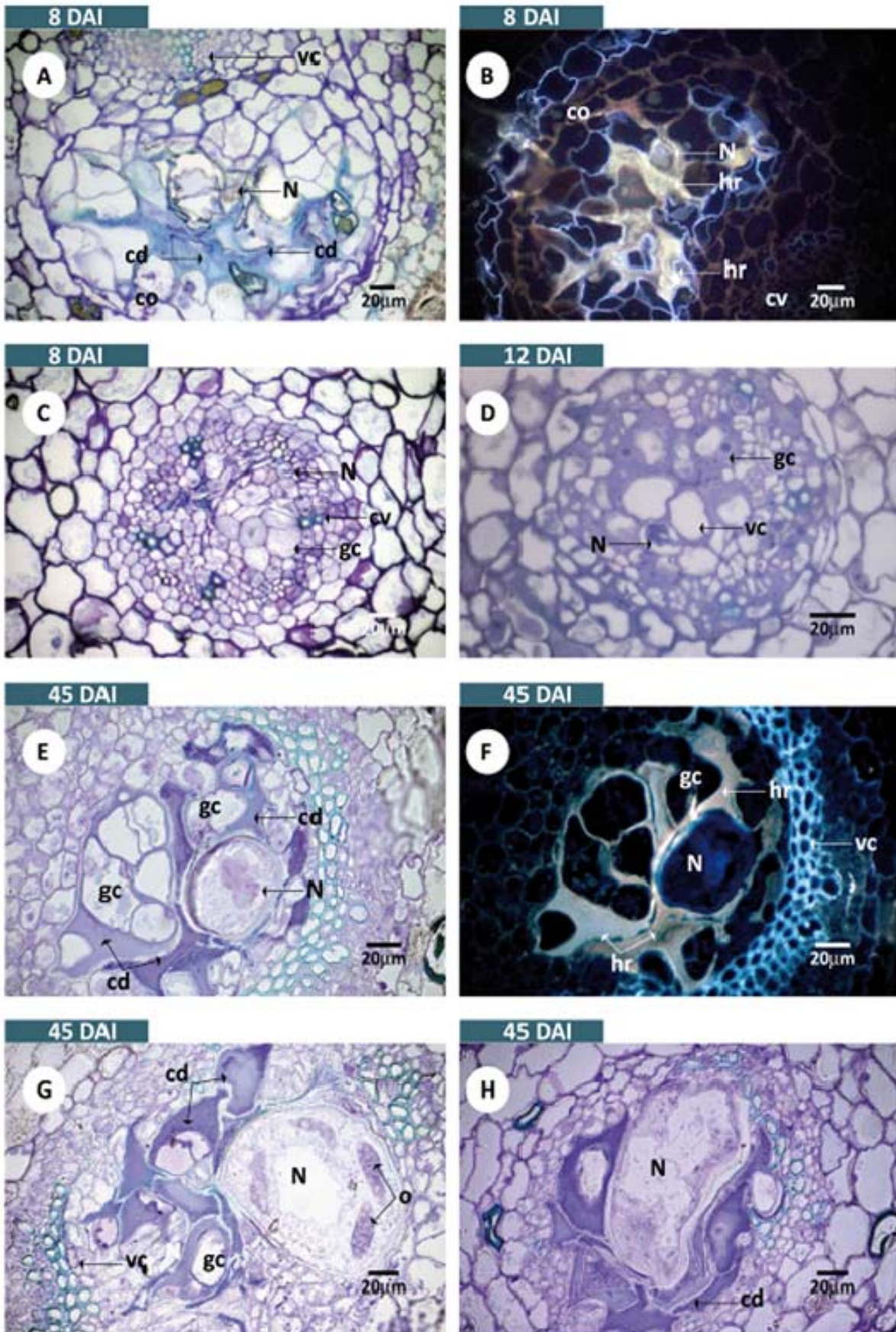


Figura 2: A – Seções de raízes de *Coffea canephora* clone 14 (resistente) inoculadas com *Meloidogyne paranaensis*. A, B: J2s penetrando, morte celular e reação de hipersensibilidade no córtex; C: formação de fêmeas jovens ao lado de células gigantes em formação; D: células gigantes vacuolizadas; E, F: fêmeas jovens ao lado de células gigante

degradadas e morte celular ou hr circundando ambas N=nematoide, cd=morte celular; hr=reação de hipersensibilidade, gc=célula gigante, vc=vacuolo, o=ovários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E. V. S.; CARNEIRO, R. M. D. G.; COSTA, P. M.; GOMES, A. C. M. M.; SANTOS, M.; PEREIRA, A. V.; NICOLE, M.; FERNANDEZ, D. & GROSSI DE SÁ, M. F. Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. *European Journal of Plant Pathology*, 127(3):365-373.(2010).
- AZURETO, F.; MOLINA, A.; FIGUEROA, P. Nemaya, una variedad de Robusta resistente a nematodos. *El Cafetal* 3:12-14. (2001).
- ANTHONY, F.; TOPART, P.; ANZUETO, F. La Resistencia genética de *Coffea* spp. a *Meloidogyne paranaensis*: identificación y utilización para la cafeicultura latinoamericana. *Manejo Integrado de Pragas y Agroecología* 67: 4-11. (2003).
- ANTHONY, F.; TOPART, P.; MARTINEZ, A.; SILVA, M. & NICOLE, M. Hypersensitive-like reaction conferred by the Mex-1 resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology* 54, 476-482. (2005).
- ARANGO, L. G.; BAEZA, C. A.; LE GUIZAMON, J. E. Pruebas de resistencia a especies de *Meloidogyne* spp. em plântulas de *Coffea* spp. *Proceedings X Int Colloq Coffee*: 563-568. (1982).
- BERTRAND, B. & ANTHONY, F. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: PLANT-PARASITIC NEMATODES OF COFFEE. Ricardo M. Souza (Ed.). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brazil. Springer Science Business Media B.V. pp. 165-190. (2008).
- BERTAND, B.; ANZUETO, A.; PEÑA, M. X. Genetic improvement of coffee for resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne* sp.) in Central America. *Proceedings X Int Colloq Coffee*:630-636. (1995).
- BERTAND, B. ; AGUILAR, G. BOMPARD, E. Comportment agronomique et résistance aux principaux dâprédateurs des lignées de Sarchimor et Catimor au Costa Rica . *Plante Rech. Dev.* 4:312-321. (1995).
- BONNETI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiros. *Fitopatologia Brasileira* 6, 553. (1987).
- BYRD J. R. D. W.; KYRKPATRICK J.; BARKER K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15, 142-143. (1983).
- CAMPOS, V. P. & VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M.; Sikora, R.A.; Bridge, J. eds. PLANT PARASITIC NEMATODES IN SUBTROPICAL AND TROPICAL AGRICULTURE. Wallingford, UK: CAB International 529-579. (2005).
- CARNEIRO, R.M.D.G. & COFCEWICZ, E. T. The taxonomy of *Meloidogyne* spp. from coffee. In R.M. Souza (Ed.), *Plant parasitic nematodes of coffee* (pp. 87-122). New York: APS Press & Springer. (2008).
- CARNEIRO, R. M. D. G.; COSTA, S. B.; SOUSA, F. R.; SANTOS, D. F.; ALMEIDA, M. R. A.; SIQUEIRA, K. M. S.; TIGANO, M. S. & FONSECA, A. F. A. Reação de cafeeiros 'Conilon' a diferentes populações de *Meloidogyne* spp. VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil: Riscos físicos , químicos e biológicos à cafeicultura, 02 a 05 de julho de 2009, Vitória, ES. (2009).
- CURI, S. M.; CARVALHO, A.; MORAES, F. P. Novas fontes de resistência genética de *Coffea* no controle do nematóide do cafeeiro, *Meloidogyne exigua*, *Biológico*, 36:293-295 (1970).
- FAZUOLI, L. C & LORDELLO, R. R. A. Fontes de resistência em espécies de cafeeiro a *Meloidogyne exigua*. *Sociedade Brasileira de Nematologia*. (1978).
- FAZUOLI, L.C.; MEDINA FILHO, H. P.; GONÇALVES, W.; GUERREIRO FILHO, O. & SILVAROLLA, M.B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas. In Zambolim , L. (Ed). O Estado da arte de Tecnologias de produção de café . Editora UFV, Viçosa, MG PP.162-215.(2002).
- GONÇALVES, W.; PEREIRA, A. Resistência do cafeeiro a nematóides. IV Reação de cafeeiros derivados do híbrido de Timor a *Meloidogyne exígua*. *Nematologia Brasileira* 22:39-50. (1998).
- HARTMAN, K. M. & SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: Barker KR, Carter CC, Sasser JN (Eds.) An advanced treatise on *Meloidogyne*, Vol. 2 Methodology. Raleigh NC. North Carolina State University Graphics. pp. 69-77. (1985).
- OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouhogeschool*, Wageningen 66, 1-46. (1966).
- PEGARD, A ; BRIZZARD, G; FAZARI, A.; SOUCAZE, O.; ABAD, P.; DJIAN-CAPORALINO, C. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathology* 95, 158-165. (2005).
- SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, W.; LIMA, M. M. Resistência do cafeeiro a nematoides. V Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridação de *Coffea arabica* com *C. canephora*. *Nematologia Brasileira* 22:551-59. (1998).